

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000801

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0019010
Filing date: 19 March 2004 (19.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0019010 호
Application Number 10-2004-0019010

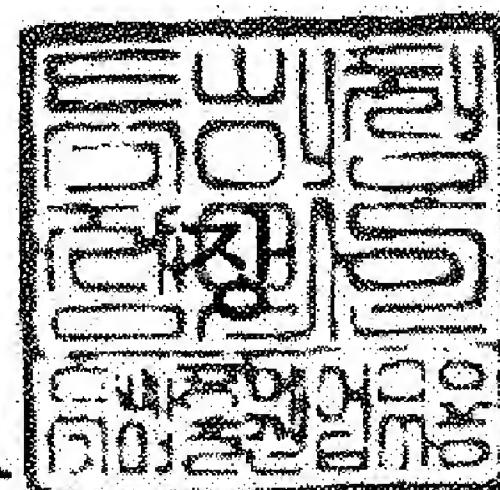
출 원 일 자 : 2004년 03월 19일
Date of Application MAR 19, 2004

출 원 인 : 재단법인서울대학교산학협력재단
Applicant(s) Seoul National University Industry
Foundation

2005년 06월 08일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허 출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.19
【발명의 국문명칭】	표면에 골조직 형성 증진 펩타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트
【발명의 영문명칭】	MEMBRANE AND IMPLANT IMMOBILIZED OSTEOGENIC ENHANCING PEPTIDES ON THE SURFACE
【출원인】	
【명칭】	재단법인 서울대학교 산학협력재단
【출원인코드】	2-2003-007067-6
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2003-019538-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박윤정
【성명의 영문표기】	PARK, Yoon Jeong
【주민등록번호】	710208-2067321
【우편번호】	152-055
【주소】	서울특별시 구로구 구로5동 롯데아파트 110-402호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	정종평
【출원인코드】	4-1998-013735-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이승진

【성명의 영문표기】	LEE, Seung Jin
【주민등록번호】	570828-1046414
【우편번호】	150-010
【주소】	서울특별시 영등포구 여의도동 한성아파트 C동 601호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	구영
【출원인코드】	4-1999-058885-1
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	60
【서열목록의 전자문서】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정 에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	27 면 38,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	8 항 365,000 원
【합계】	403,000 원
【감면사유】	전담조직
【감면후 수수료】	201,500 원
【첨부서류】	1. 전담조직임을 증명하는 서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 표면에 골조직 형성 증진 웹타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트에 관한 것으로, 구체적으로 가교제가 결합된 표면에 세포부착유도 웹타이드 또는 조직성장인자 유래 웹타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트에 관한 것이다.

본 발명의 차폐막 및 임플란트는 표면에 약리활성을 부여하여 재생에 관련된 세포의 이행, 증식 및 분화를 촉진하여 최종적으로 조직재생력을 극대화시킬 수 있다. 또한 표면에 고정된 약리활성을 부여하기 위한 웹타이드는 분자량이 적어 체내에 적용시 면역반응의 위험이 없고 화학적 조작에 의해 체내에서 안정한 형태로 존재할 수 있어 약효의 지속화가 가능하며, 치주조직 수술시 용이하게 고안된 웹타이드를 차폐막 표면에 붙여서 술식에 바로 적용함으로써 수술 편의성이 우수하며 또한 치료효과의 최대화를 기대할 수 있다.

【대표도】

도 2b

【색인어】

조직성장인자, 웹타이드, 고정화, 키토산 차폐막, 임플란트.

【명세서】

【발명의 명칭】

표면에 골조직 형성 증진 웨타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트{MEMBRANE AND IMPLANT IMMOBILIZED OSTEOGENIC ENHANCING PEPTIDES ON THE SURFACE}

【도면의 간단한 설명】

<1> **도 1**은 본 발명에 의해 차폐막에 고정된 웨타이드의 전자표면분석 결과를 나타낸 것으로,

<2> **도 1a**는 웨타이드가 고정되지 않은 키토산 나노섬유로 제작된 차폐막의 표면 분석결과를 나타낸 그래프이며,

<3> **도 1b**는 유황을 함유한 웨타이드가 고정된 키토산 나노섬유로 제작된 차폐막의 표면분석결과를 나타낸 그래프이다.

<4> **도 2**는 본 발명의 차폐막의 세포 부착양상을 나타낸 SEM 사진으로서,

<5> **도 2a**는 웨타이드가 고정되지 않은 차폐막의 세포 부착양상을 나타낸 것이며,

<6> **도 2b** 및 **도 2c**는 BMP 및 Bone sialoprotein으로부터 유래된 웨타이드가 각각 고정된 차폐막의 세포 부착양상을 나타낸 것이다.

<7> **도 3**은 본 발명의 차폐막의 세포 부착도를 정량적으로 분석한 그래프이다.

<8> **도 4**는 본 발명의 차폐막에 세포를 분주하여 배양한 후 일정기간 배양하고,

배양된 세포를 수거하여 세포내의 오스테오칼신의 양을 RT-PCR 실험을 통해 정량한 결과를 나타낸 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<9> 본 발명은 표면에 골조직 형성 증진 웹타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트에 관한 것이다.

<10> 치아를 지지하는 치주조직은 크게 치조골, 치조골과 치아 사이의 치근막을 구성하는 치주 인대조직, 상피조직, 그리고 결체조직으로 이루어진다. 치주염의 진행으로 인한 치조골의 소실은 치주 인대조직의 상실을 동반하며, 치주염 치료 후 소실된 조직 부위에서는 결제조직의 과다생장으로 인해 치조골과 치주 인대조직의 정상적인 회복이 불가능하여진다. 또 새로운 뼈가 생성되더라도 치주 인대조직이 정상적으로 분화되지 않아 치아기능상실을 유발할 수 있다. 따라서, 이러한 문제를 해결하기 위하여 치조골 재생술로 자가골이식(autografting)술과 함께 인위적인 차폐막을 이용하여 완전한 조직의 재생 또는 신형성을 유도하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다. 최근 10여년 동안에 차폐막의 도입을 통하여 효과적으로 치주 조직의 재생을 유도한 사례(J. Gottlow, et al., *J. Clin. Perio*, 13, (1986) pp.

604~616)가 보고된 이래 여러가지 소재를 차폐막으로 이용하여 조절적 유도조직재생에 대한 연구가 진행되어 왔다.

<11> 한편, 차폐막의 조직 재생을 향상시키기 위해, 차폐막에 조직 재생을 향상시킬 수 있는 물질들을 부착하는 연구가 진행되고 있다. 이 중 세포외 기질 물질(Extracellular matrix)이나 특정 조직성장인자들은 생체내에서 조직손상을 수복하고 재생시키는 능력이 탁월한 것으로 보고되어져 왔으며, 실제 임상에서도 우수한 조직재생력을 다수의 결과에서 확인된바 있다.

<12> 그러나 이들 대부분의 세포외기질 및 성장인자들은 상대적으로 고가이고, 분자량이 수십 KDa에 이르는 고분자량의 단백질로서 그 활성을 유지하기 위해서는 특정 삼차구조를 항상 보존해야하는 조건이 필수적이나 실제로 생체 내에서는 불안정하여 활성이 떨어지는 단점이 지적되어져 왔다. 특히 수 분 이내로 체내에서 소실되어지므로 원하는 치료효과를 얻기 위해서는 대용량을 투여해야 하는 어려운 점이 있으며 이로 인한 부작용 유발 또한 단점으로 지적되어져 왔다.

<13> 최근 유도 조직 재생술식 (Guided Tissue Regeneration, GTR) 및 임플란트 시술에 적용되는 유도골재생술 (Guided Bone Regeneration, GBR)에 활용되는 고분자 차폐막이나 조직공학기술 (Tissue Engineering)에 활용되는 고분자 지지체 (scaffold)에 상기 조직성장인자들을 함유시켜 서방출화함으로써 단순 적용에 따른 단점을 경감하고자 하는 시도가 이루어져 왔으며 어느정도 그 효과도 입증 되었다. 그러나 이들 고분자 차폐막이나 지지체에 의해서는 조직성장인자가 물리적으로 혼

합되어져 있는 상태로서 초기 적용시 속방출 (burst release)이 일어나 치료기간동안 유효농도 유지가 어려운 단점이 지적되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<14> 본 발명의 목적은 상기한 종래기술의 문제점을 개선하기 위한 것으로, 구체적으로 저농도의 용량으로도 원하는 조직재생효과를 얻을 수 있는 조직성장인자의 활성부위로 이루어진 웹타이드가 그 활성을 유지한 채로 표면에 안정하게 고정된 차폐막 및 임플란트를 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<15> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가교제가 결합된 표면에 세포부착유도 웹타이드 또는 조직성장인자 유래 웹타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트를 제공한다.

<16> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<17> 본 발명은 표면에 약리활성을 갖도록 하여 치주조직 재생효율을 증가시킬 수 있는 조직재생용 고분자 차폐막 및 임플란트를 제공하는 것으로, 상기 약리활성은 차폐막 또는 임플란트 표면에 약리활성을 갖는 웹타이드를 고정시킴으로써 성취할 수 있다.

<18> 상기 펩타이드는 세포부착 유도 펩타이드 또는 조직성장인자 유래 펩타이드를 사용한다. 상기 세포부착 유도 펩타이드 또는 조직성장인자 유래 펩타이드는 생리활성 시토킨(cytokine)에서 활성부위의 아미노산 배열을 분리추출한 것으로, 추출 후에 화학적 수식을 거쳐 활성구조를 유지하도록 하였다.

<19> 구체적으로, 상기 세포부착 유도 펩타이드는 일반적으로 사용되는 서열번호 1로 표시되는 아미노산을 포함하는 펩타이드를 사용하며, 바람직하게는 서열번호 2 또는 상기 서열번호 1의 아미노산을 RGD를 구조적으로 안정하게 유지하고자 고안된 서열번호 3을 사용한다. 또한, 상기 조직성장인자 유래 펩타이드는 조직성장인자 의 활성영역으로부터 유래된 것을 동정하여 화학적으로 합성한 것을 사용한다. 구체적으로,

<20> (a) 골형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP)-2의 283-302번 위치의 아미노산(서열번호 4), 335-353번 위치의 아미노산(서열번호 5), 370-390번 위치의 아미노산(서열번호 6);

<21> BMP-4의 293-313번 위치의 아미노산(서열번호 7), 360-379번 위치의 아미노산(서열번호 8), 382-402번 위치의 아미노산(서열번호 9);

<22> BMP-6의 397-418번 위치의 아미노산(서열번호 10), 472-490번 위치의 아미노산(서열번호 11), 487-510번 위치의 아미노산(서열번호 12);

<23> BMP-7의 320-340번 위치의 아미노산(서열번호 13), 390-409번 위치의 아미노산(서열번호 14), 405-423번 위치의 아미노산(서열번호 15);

<24> (b) Bone sialoprotein의 199-204번 위치의 아미노산(서열번호 16), 151-158번 위치의 아미노산(서열번호 17), 275-291번 위치의 아미노산(서열번호 18), 20-28번 위치의 아미노산(서열번호 19), 65-90번 위치의 아미노산(서열번호 20), 150-170번 위치의 아미노산(서열번호 21), 280-290번 위치의 아미노산(서열번호 22),

<25> (c) 변형성장인자(Transforming growth factor) beta 1의 242-250번 위치의 아미노산(서열번호 23), 279-299번 위치의 아미노산(서열번호 24), 343-361번 위치의 아미노산(서열번호 25),

<26> (d) 혈소판 유래 성장인자의 100-120번 위치의 아미노산(서열번호 26), 121-140번 위치의 아미노산(서열번호 27),

<27> (e) 산성 섬유아세포 성장인자(acidic fibroblast growth factor)의 23-31번 위치의 아미노산(서열번호 28), 97-105번 위치의 아미노산(서열번호 29),

<28> (f) 염기성 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor)의 16-27번 위치의 아미노산(서열번호 30), 37-42번 위치의 아미노산(서열번호 31), 78-84번 위치의 아미노산(서열번호 32), 107-112번 위치의 아미노산(서열번호 33),

<29> (g) Dentin Sialoprotein의 255-275번 위치의 아미노산(서열번호 34), 475-494번 위치의 아미노산(서열번호 35), 551-573번 위치의 아미노산(서열번호 36),

<30> (h) 혼파린 결합 EGF-유사 성장 인자(Heparin binding EGF-like growth factor)의 63-83번 위치의 아미노산(서열번호 37), 84-103번 위치의 아미노산(서열번호 38), 104-116번 위치의 아미노산(서열번호 39), 121-140번 위치의 아미노산

(서열번호 40),

<31> (i) Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3의 326-350번 위치의 아미노산(서열번호 41), 351-371번 위치의 아미노산(서열번호 42), 372-400번 위치의 아미노산(서열번호 43), 401-423번 위치의 아미노산(서열번호 44), 434-545번 위치의 아미노산(서열번호 45), 546-651번 위치의 아미노산(서열번호 46), 1375-1433번 위치의 아미노산(서열번호 47), 1435-1471번 위치의 아미노산(서열번호 48), 1475-1514번 위치의 아미노산(서열번호 49), 1515-1719번 위치의 아미노산(서열번호 50), 1764-1944번 위치의 아미노산(서열번호 51), 2096-2529번 위치의 아미노산(서열번호 52),

<32> (j) Osteoblast specific Cadherin(OB-Cadherin)의 54-159번 위치의 아미노산(서열번호 53), 160-268번 위치의 아미노산(서열번호 54), 269-383번 위치의 아미노산(서열번호 55), 384-486번 위치의 아미노산(서열번호 56), 487-612번 위치의 아미노산(서열번호 57), 이며,

<33> 상기 펩타이드는 N-말단에 두개의 글리신 (Glycine)잔기와 시스테인을 부가하여 펩타이드의 구조를 안정화 하고 화학적으로 차폐막의 고정에 용이하도록 한다.

<34> 이러한 펩타이드는 1종 또는 2종 이상의 혼합 펩타이드를 차폐막에 고정시킬 수 있다. 상기 활성 펩타이드는 전체 조직성장인자의 아미노산 배열 중 10~20개 단위의 아미노산 배열을 각각 합성하여 이들로부터 세포접착력 실험을 시행하여 가장 활성이 높은 아미노산 배열을 선택하여 이들의 말단에 다시 화학적 수식을 가

한 후 차폐막 및 임플란트 표면에 고정이 용이하도록 고안한 것으로서 차폐막은 표면에 최소단위의 아미노산 배열만으로 활성을 유지함과 동시에 조직성장인자의 물리적인 함입 및 도포에 따르는 약의 손실 및 부작용을 줄일수 있어 치료효과에 부가적인 이점을 제공할 수 있다.

<35> 본 발명에 의해 표면이 활성화될 차폐막은 본 분야에서 사용할 수 있는 모든 종류 및 형태의 차폐막을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 다공성 폴리락트산 차폐막; 키틴 또는 키토산의 나노섬유로 제조된 재생막 또는 필름형태의 차폐막이 포함된다. 또한 임플란트는 본 분야에서 사용할 수 있는 모든 종류의 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 티타늄 임플란트를 사용한다. 이때, 임플란트의 표면은 활성 웨타이드가 부착하는데 용이하도록 산화 및 질소화를 거친 것을 포함한다.

<36> 본 발명의 웨타이드는 각각 그 웨타이드의 N말단에 자유 아미노기 또는 시스테인을 지니고 있어서 가교제에 의한 차폐막으로의 고정이 용이하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 가교제는 1,4-비스-말레이미도부탄(1,4-Bis-maleimidobutane; BMB), 1,11-비스-말레이미도테트라에틸렌글리콜(1,11-Bis-Maleimidotetraethyleneglycol; BM[PEO]₄), 1-에틸-3-[3-디메틸 아미노프로필]카르보디이미드 히드로클로리드(1-Ethyl-3-[3-dimethyl aminopropyl] carbodiimide hydrochloride; EDC), 숙신이미딜-4-[4-말레이미도메틸시클로헥산-1-카르복시-

[6-아미도카프로에이트](Succinimidyl-4-[N-maleimidomethylcyclohexane-1-carboxy-[6-amidocaproate]; SMCC) 및 그의 설폰화염(Sulfo-SMCC), 숙시이미딜 6-[3-(2-피리딜디티오)-프로파온아미도]헥사노에이트(Succimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)- propionamido]hexanoate; SPDP) 및 그의 설폰화염 (Sulfo-SPDP), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester; MBS) 및 그의 설폰화염 (Sulfo-MBS), 숙시이미딜 4-[p-말레이미도페닐]부티레이트(Succimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrate; SMPB) 및 그의 설폰화염 (Sulfo-SMPB)이 바람직하다.

<37> 또한 본 발명은 상기 웹타이드를 차폐막 및 임플란트의 표면에 화학적으로 결합시켜 표면에 단위면적당 0.1~4.0 mg^o 고정되도록 하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 웹타이드는 10~20개의 아미노산 함량을 지니며 이들은 차폐막 및 임플란트의 표면단위 면적당 1~2 mg^o 고정되는 것이다.

<38> 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하나, 이에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<실시예 1> 세포부착성 RGD 웹타이드의 키토산 차폐막으로의 고정화

<40> 키토산 차폐막을 2 ml의 인산완충액 (pH 7.4)에 가하여 차폐막의 표면을 수

화시킨 후 여기에 가교제로서 셀폰산화된 숙신이미딜-4-[N-말레이미도메틸시클로헥산-1-카르복시-[6-아미도카프로에이트](Sulfonated Succinimidyl-4-[N-maleimidomethylcyclohexane-1-carboxy-[6-amidocaproate]; Sulfo-SMCC)를 5 mg/ml의 농도로 가하고, 2 시간동안 교반하여 차폐막의 표면에 반응기를 도입하였다. 2 시간 상온반응 후 차폐막을 세척하고 여기에 5 mg의 서열번호 2의 웨타이드를 100 μ l의 인산완충액에 녹인 용액을 가하여 24시간동안 반응시키고, 세척한 후 웨타이드가 고정된 차폐막을 제조하였다.

<41> <실시예 2> 세포부착성 RGD 웨타이드의 폴리락트산 차폐막으로의 고정화

<42> 폴리락트산 차폐막을 인산완충액 (pH 4.7)에 가하여 표면을 수화시킨 후 염산 시스타민(cystamine, 20mg/ml)의 용액과 반응시켰다. 여기에 가교제로서 1-에틸-3-[3-디메틸 아미노프로필] 카르보디이미드 히드록클로리드(1-Ethyl-3-[3-dimethyl aminopropyl] carbodiimide hydrochloride; EDC)를 적가하여 폴리락트산의 표면의 카르복실산을 활성화시켰다. 24시간 반응 후 세척한 다음 1 ml의 디티오트레니올(dithiothreitol; DTT) 용액 (30mg/ml)을 가하여 다시 24시간 동안 반응하여 차폐막의 표면에 Sulfhydryl기가 도입되도록 하였다. 상기 차폐막은 세포부착성 RGD 웨타이드 서열번호 2와 혼합하여 차폐막과 웨타이드간 S-S의 결합을 자발적으로 유도할 수 있어 용시에 고정할 수 있도록 하였다.

<43> <실시예 3> 조직성장인자 유래 웨타이드의 키토산 차폐막으로의 고정화

<44> 본 발명의 조직성장인자 중 골형성 단백질 (BMP-2)의 세포부착 및 활성 도메인의 아미노산 배열을 함유하면서 N-말단부위에 시스테인을 지니도록 고안된 웹타이드인 서열번호 58 웹타이드는 화학적 방법으로 합성한 것으로 사용하였다.

<45> 한편, 키토산 차폐막을 2ml의 인산완충액 (pH 7.4)에 가하여 차폐막의 표면을 수화시킨 후 여기에 가교제로서 Sulfo-SMCC를 5 mg/ml의 농도로 가하여 2시간동안 교반하여 차폐막의 표면에 반응기를 도입하였다. 2시간 상온반응 후 차폐막을 세척하고 여기에 5 mg의 서열번호 58 웹타이드를 100 μ l의 인산완충액에 녹인 용액을 가하여 24 시간동안 반응시켜 세척한 후 웹타이드가 고정된 차폐막을 제조하였다.

<46> <실시예 4>조직성장인자 유래 웹타이드의 폴리락트산 차폐막으로의 고정화

<47> 본 발명의 조직성장인자 중 골형성 단백질 (BMP-2)의 세포부착 및 활성 도메인의 아미노산 배열을 함유하면서 N-말단부위에 시스테인을 지니도록 고안된 웹타이드인 서열번호 58 웹타이드는 화학적 방법으로 합성한 것을 사용하였다.

<48> 한편, 폴리락트산 차폐막을 인산완충액 (pH 4.7)에 가하여 표면을 수화시킨 후 염산 시스타민(20mg/ml)의 용액과 반응시켰다. 여기에 가교제로서 EDAC를 적가하여 폴리락트산의 표면의 카르복실산을 활성화시켰다. 24시간 반응 후 세척한 다음 1 ml의 DTT용액 (30mg/ml)을 가하여 다시 24시간 동안 반응하여 차폐막의 표면에 Sulfhydryl기가 도입되도록 하였다. 상기 차폐막은 조직성장인자 유래 웹타이

드인 서열번호 58 펩타이드와 혼합하여 차폐막과 펩타이드간 S-S의 결합을 자발적으로 유도할 수 있어 용시에 고정할 수 있도록 하였다.

<49> <실시예 5> Bone sialoprotein의 부착 및 활성부위를 함유하는 펩타이드의 키토산 차폐막으로의 고정

<50> N-말단 부위에 스스테인을 지닌 본 발명의 Bone sialoprotein의 석회화유도 활성 도메인구조 (아미노산 서열)를 포함하는 펩타이드(서열번호 59) 및 세포부착 기능부위인 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 (서열번호 60)는 화학적으로 합성한 것을 사용하였다.

<51> 한편, 키토산 차폐막을 2 ml의 인산완충액 (pH 7.4)에 가하여 차폐막의 표면을 수화시킨 후 여기에 가교제로서 Sulfo-SMCC를 5 mg/ml의 농도로 가하여 2시간동안 교반하여 차폐막의 표면에 반응기를 도입하였다. 2시간 상온반응 후 차폐막을 세척하고 여기에 5 mg의 상기 펩타이드를 100 μ l의 인산완충액에 녹인 용액을 가하여 24 시간동안 반응시켜 세척한 후 펩타이드가 고정된 차폐막을 제조하였다.

<52> <실시예 6> Bone sialoprotein의 부착 및 활성부위를 함유하는 펩타이드의 폴리락트산 차폐막으로의 고정

<53> N-말단 부위에 스스테인을 지닌 본 발명의 Bone sialoprotein의 석회화유도 활성 도메인구조 (아미노산 서열)를 포함하는 펩타이드(서열번호 59) 및 세포부착

기능부위인 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 (서열번호 60)는 화학적으로 합성한 것을 사용하였다.

<54> 한편, 폴리락트산 차폐막을 인산완충액 (pH 4.7)에 가하여 표면을 수화시킨 후 염산 시스타민 (20mg/ml)의 용액과 반응시켰다. 여기에 가교제로서 EDAC를 적 가하여 폴리락트산의 표면의 카르복실산을 활성화시켰다. 24시간 반응 후 세척한 다음 1 ml의 DTT용액 (30mg/ml)을 가하여 다시 24시간 동안 반응하여 차폐막의 표면에 Sulfhydryl기가 도입되도록 하였다. 상기 차폐막은 상기 제조된 펩타이드와 혼합하여 차폐막과 펩타이드간 S-S의 결합을 자발적으로 유도할 수 있어 용시에 고정할 수 있도록 하였다.

<55> <실시예 7> 세포부착성 RGD 펩타이드의 티타늄 임플란트로의 고정화

<56> 티타늄으로 이루어진 임플란트의 표면을 질소화 플라즈마처리하여 아민기를 표면에 노출시킨 후 여기에 가교제로서 Sulfo-SMCC를 5mg/ml의 농도로 가하여 2시간동안 교반하여 표면에 반응기를 도입하였다. 2시간 상온반응 후 임플란트를 세척하고 여기에 5mg의 서열번호 2 펩타이드를 100ul의 인산완충액에 녹인 용액을 가하여 24시간동안 반응시켜 세척한 후 펩타이드가 고정된 임플란트를 제작하였다.

<57> <실시예 8> 조직성장인자 유래 펩타이드의 티타늄 임플란트로의 고정화

<58> 본 발명의 조직성장인자 중 골형성 단백질 (BMP-2)의 세포부착 및 활성 도메

인의 아미노산 배열을 함유하면서 N-말단부위에 시스테인을 지니도록 고안된 웨타이드인 서열번호 58 웨타이드는 화학적 방법으로 합성한 것을 사용하였다.

<59> 한편, 티타늄으로 이루어진 임플란트의 표면을 질소화 플라즈마처리하여 아민기를 표면에 노출시킨 후 여기에 가교제로서 Sulfo-SMCC를 5mg/ml의 농도로 가하여 2시간동안 교반하여 표면에 반응기를 도입하였다. 2시간 상온반응 후 임플란트를 세척하고 여기에 5 mg의 웨타이드를 100 μl 의 인산완충액에 녹인 용액을 가하여 24시간동안 반응시켜 세척한 후 웨타이드가 고정된 임플란트를 제작하였다.

<60> <실시예 9> Bone sialoprotein의 부착 및 활성부위를 함유하는 티타늄 임플란트로의 고정화

<61> N-말단 부위에 스스테인을 지닌 본 발명의 Bone sialoprotein의 석회화유도 활성 도메인구조 (아미노산 서열)를 포함하는 웨타이드(서열번호 59) 및 세포부착 기능부위인 아미노산 서열을 포함하는 웨타이드 (서열번호 60)는 화학적으로 합성된 것을 사용하였다.

<62> 한편, 티타늄으로 이루어진 임플란트의 표면을 질소화 플라즈마처리하여 아민기를 표면에 노출시킨 후 여기에 가교제로서 Sulfo-SMCC를 5 mg/ml의 농도로 가하여 2시간동안 교반하여 표면에 반응기를 도입하였다. 2시간 상온반응 후 임플란트를 세척하고 여기에 5 mg의 웨타이드를 100 μl 의 인산완충액에 녹인 용액을 가하여 24 시간동안 반응시켜 세척한 후 웨타이드가 고정된 임플란트를 제작하였다.

<63> <실험 예 1> 차폐막 표면 분석

<64> 실시예 1 내지 6에서 제조된 각각의 펩타이드가 고정된 차폐막의 표면을 분석하기 위하여, 제작된 차폐막을 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 용액으로 고정하였다. 고정된 차폐막을 1%의 오스뮴 테트로록시드(osmium tetroxide) 용액으로 처리한 후 세척하여 탈수 및 건조하였다.

<65> 건조된 차폐막의 표면을 XPS방법에 의해 분석하였다. 이 방법은 표면에 고정된 원소를 동정하여 결합의 유무를 확인하는 방법인데 본 발명에 의해 고정된 펩타이드와 차폐막의 사이에는 유황결합(disulfide bond)가 존재하므로 유황의 존재 유무로 결합을 확인할 수 있었다.

<66> 도 1a 및 도 1b는 본 발명에 의해 차폐막에 고정된 펩타이드의 분석결과를 나타낸 그래프로서, 전자표면분석을 통해 표면에 존재하는 유황(Sulfur)의 존재유무를 확인하였다. 구체적으로 도 1a는 펩타이드가 수식되지 않은 키토산 나노섬유로 제작된 차폐막의 표면분석을 나타낸 것이며, 도 1b는 유황을 함유한 펩타이드가 고정된 차폐막으로서, 표면의 분석된 유황의 존재로서 펩타이드가 고정되었음을 알 수 있다.

<67> <실험 예 2> 차폐막으로의 세포부착력 실험

<68> 실시예 1, 3, 5에 의해 제조된 펩타이드 부착 차폐막에 골아세포를 접종한

후 4시간 및 1일에 걸쳐 배양하였다. 배양한 후 차폐막을 2% 글루타르알데히드 (glutaraldehyde) 용액으로 고정하였다. 고정된 차폐막을 1%의 오스뮴 테트로옥시드(osmium tetroxide) 용액으로 처리한 후 세척하여 탈수 및 건조하였다.

<69> 건조된 차폐막의 표면은 시차주사 전자현미경으로 분석하였다. 도 2a 내지 도 2c는 웹타이드가 수식된 차폐막으로의 세포의 부착양상을 나타낸 SEM 사진이다. 도 2a는 수식되지 않은 차폐막으로의 세포부착을 나타낸 것이며, 도 2b 및 도 2c는 각각 BMP 및 Bone sialoprotein으로부터 유래된 웹타이드가 각각 고정된 차폐막으로의 세포부착을 나타낸 것이다. 세포부착결과 웹타이드가 고정되지 않은 차폐막의 세포부착도가 크지 않은 반면 BMP 및 Bone sialoprotein으로부터 유래된 웹타이드가 고정된 차폐막으로는 이미 4시간 째에도 현저히 많은 세포가 안정하게 부착되었음을 관찰할 수 있었다.

<70> 또한, 도 3은 세포 부착도를 정량적으로 분석한 결과로서, 도 3에서 보는 바와 같이, 표면에 수식되지 않은 키토산의 차폐막 보다도 웹타이드가 수식된 경우 세포의 부착정도가 현저히 증가됨을 알 수 있다.

<71> <실험 예 3> 웹타이드 고정 차폐막에 배양된 골아세포의 오스테오칼신의 발현

<72> 골아세포를 차폐막 및 웹타이드가 고정된 차폐막의 표면에 접종한 후 2주간 배양하였다. 배양후 세포내의 총 RNA를 추출하고 이의 양을 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 이중 0.5 μ g의 RNA로부터 0.5 μ g의 올리고dT primer를 이용하여 cDNA로 역전사한 후 쥐의 오스테오칼신 단백질의 primer와 연쇄중합반응기를

이용하여 역전사된 cDNA를 증폭하였다. 이후 증폭된 DNA는 2% 아가로즈 젤 상에서 전기영동시킨 후 SYBR Gold 핵산 염색시약으로 염색하여 관찰하였다.

<73> 도 4는 세포내의 오스테오칼신(osteocalcin) 발현을 RT-PCR실험을 통해 나타낸 것이다. 도 4에서 보는 바와 같이, 펩타이드가 고정된 차폐막의 표면에 배양된 골아세포에서 오스테오칼신의 발현이 고정되지 않은 차폐막에 배양된 세포에서보다도 현저히 증가하였음을 나타내주며, 이로 인해 차폐막의 표면에 조직성장인자유래 펩타이드의 고정이 세포의 골조직으로의 분화를 촉진함을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<74> 상술한 바와 같이, 본 발명의 활성펩타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트는 차폐막 및 임플란트의 표면에 조직성장인자의 활성부위 펩타이드를 고정하는 것만으로도 현저한 세포접착력 및 골조직으로의 분화를 촉진함을 알 수 있다. 이는 기존의 방법에 의한 조직성장인자의 활용의 단순 함입에 의한 빠른 분해 및 체내 누출에 따르는 부작용을 막을수 있다는 점과 국소농도를 높이기 위해 다량을 적용함에 따르는 막대한 비용을 절감할 수 있는 두가지 장점을 가지고 있다. 펩타이드는 전체조직성장인자보다도 체내 효소반응에 민감하지 않고 체내 면역원성도 낮으므로 펩타이드를 차폐막이나 임플란트의 표면에 고정하여 술식에 이용하는 경우 원하는 농도의 활성 펩타이드가 국소에서 존재하면서 활성을 나타내어 치료효과를 증가할 수 있어 골조직 및 치주조직 재생 치료에 적합한 특징을 갖는다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

가교제가 결합된 표면에 세포부착유도 웹타이드 또는 조직성장인자 유래 웹타이드가 고정된 차폐막 및 임플란트.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 세포부착유도 웹타이드가 서열번호 1로 표시되는 아미노산(RGD)을 포함하는 세포부착유도 웹타이드인 것을 특징으로 하는 차폐막 및 임플란트.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산을 포함하는 세포부착유도 웹타이드가 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 웹타이트인 것을 특징으로 하는 차폐막 및 임플란트.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 조직성장인자 유래 웹타이드가 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6; 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9; 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12; 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15; 서열번호 16, 서열번호 17,

서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56 또는 서열번호 57의 아미노산 서열을 가지는 웹타이드이며, 상기 웹타이드의 N-말단에 두개의 글리신 잔기와 시스테인이 부가된 것을 특징으로 하는 차폐막 및 임플란트.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 웹타이드가 표면에 1 종 또는 그 이상의 혼합 웹타이드로 고정되는 것을 특징으로 하는 차폐막 및 임플란트.

【청구항 6】

제 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차폐막이 다공성 폴리락트산 차폐막; 키틴 또는 키토산의 나노섬유로 제조된 재생막 또는 필름형태의 차폐막이고,

상기 임플란트가 티타늄 임플란트인 것을 특징으로 하는 차폐막 및

임플란트.

【청구항 7】

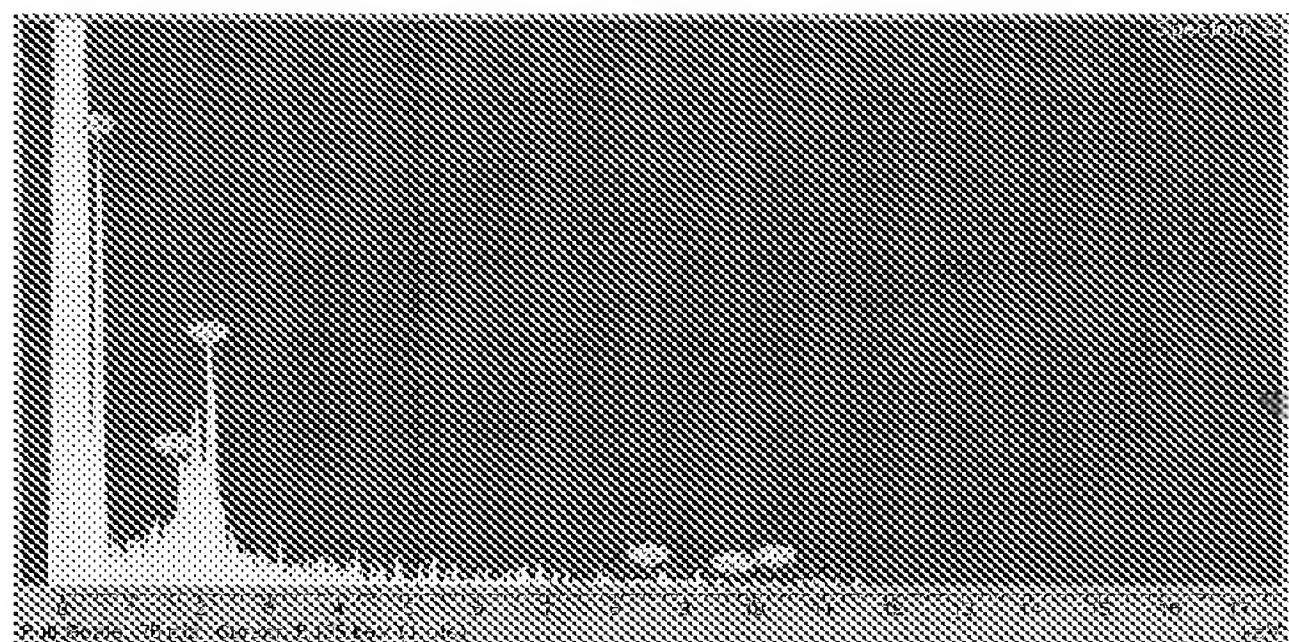
제 1항에 있어서, 상기 가교제가 1,4-비스-말레이미도부탄, 1,11-비스-말레이미도테트라에틸렌글리콜, 1-에틸-3-[3-디메틸 아미노프로필]카르보디이미드 히드로클로리드, 숙신이미딜-4-[4-말레이미도메틸시클로헥산-1-카르복시-[6-아미도카프로에이트] 및 그의 설폰화염, 숙시이미딜 6-[3-(2-페리딜디티오)-프로피온아미도]헥사노에이트 및 그의 설폰화염, m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르 및 그의 설폰화염 (Sulfo-MBS), 숙시이미딜 4-[p-말레이미도페닐]부티레이트 및 그의 설폰화염로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 차폐막 및 임플란트.

【청구항 8】

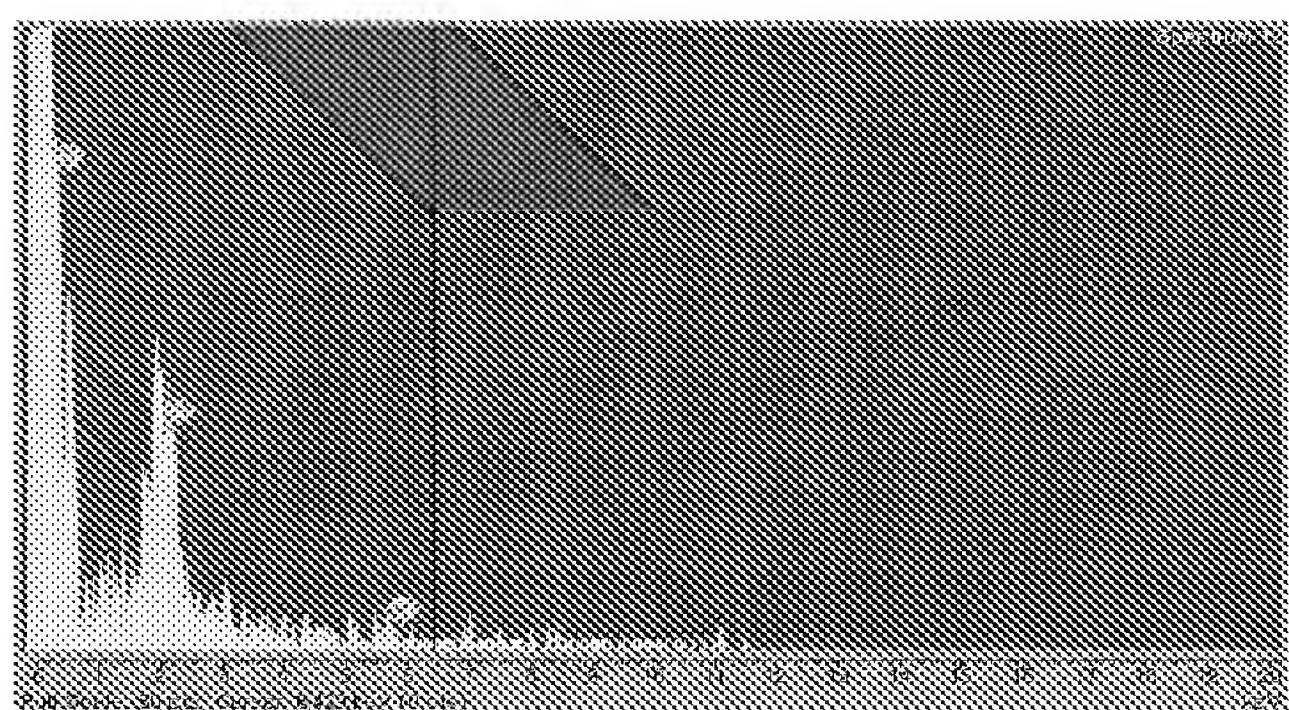
제 1항에 있어서, 상기 표면에 고정되는 웹타이드의 용량이 0.01~5 mg인 것을 특징으로 하는 차폐막 및 임플란트.

【도면】

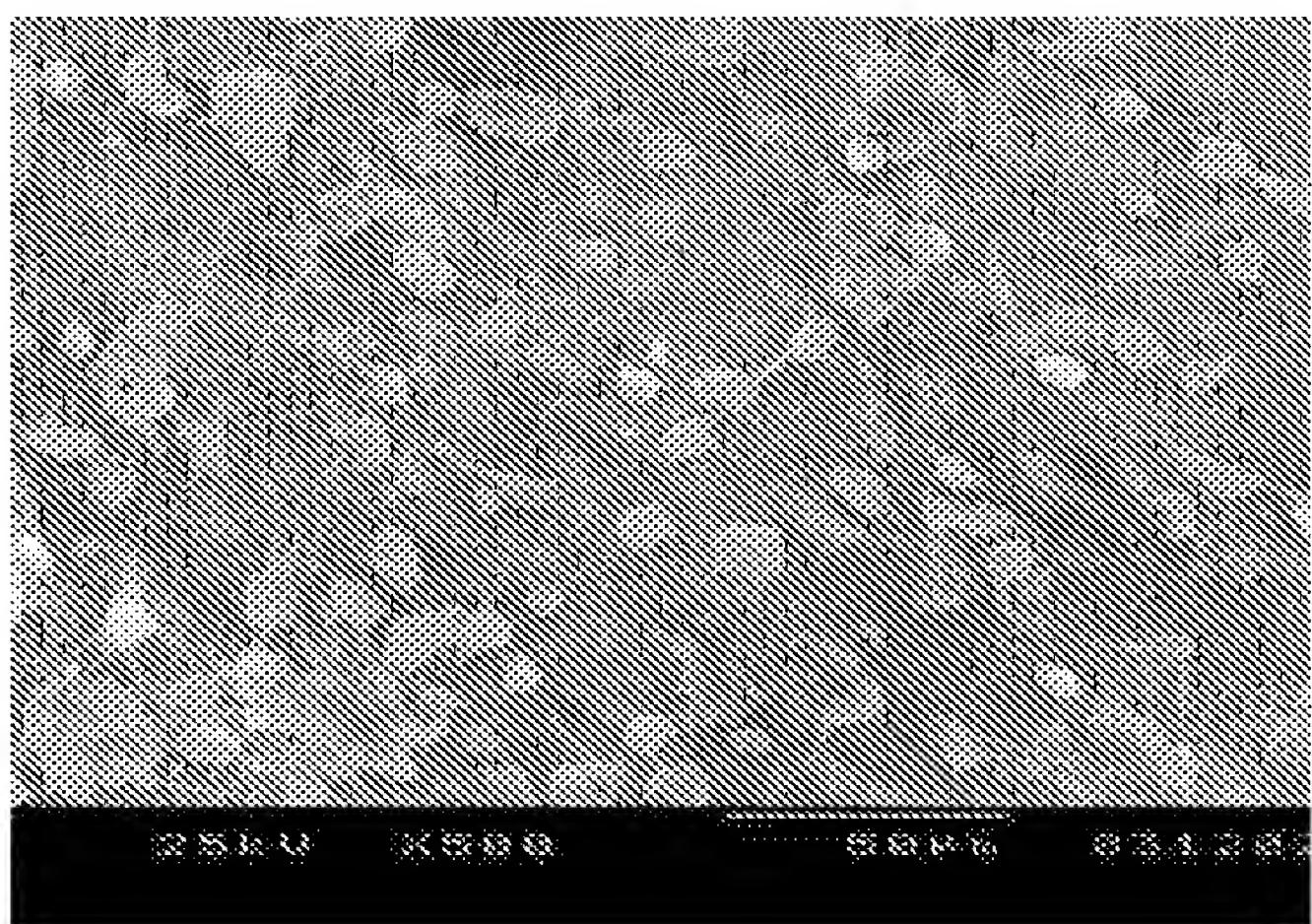
【도 1a】



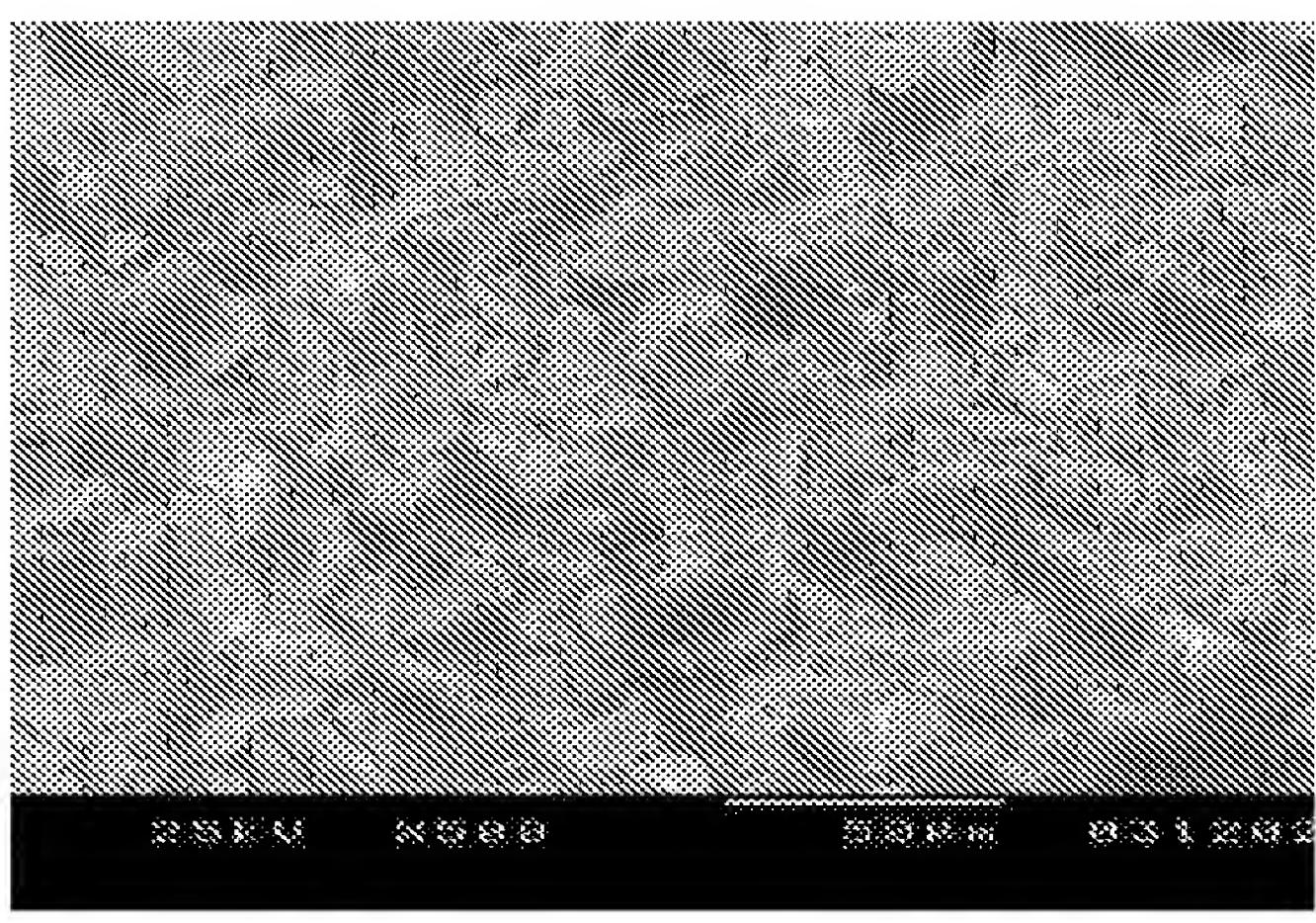
【도 1b】



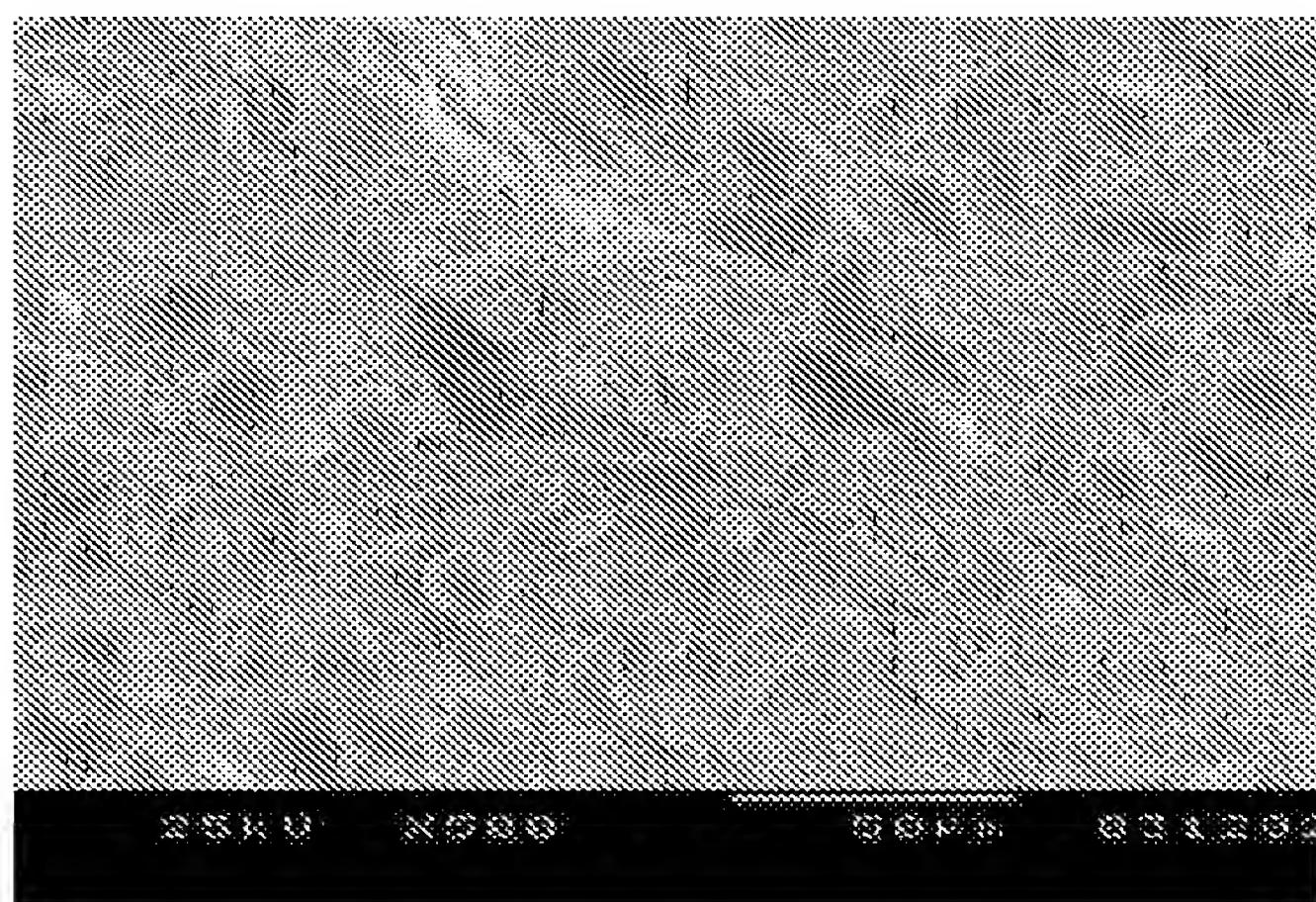
【도 2a】



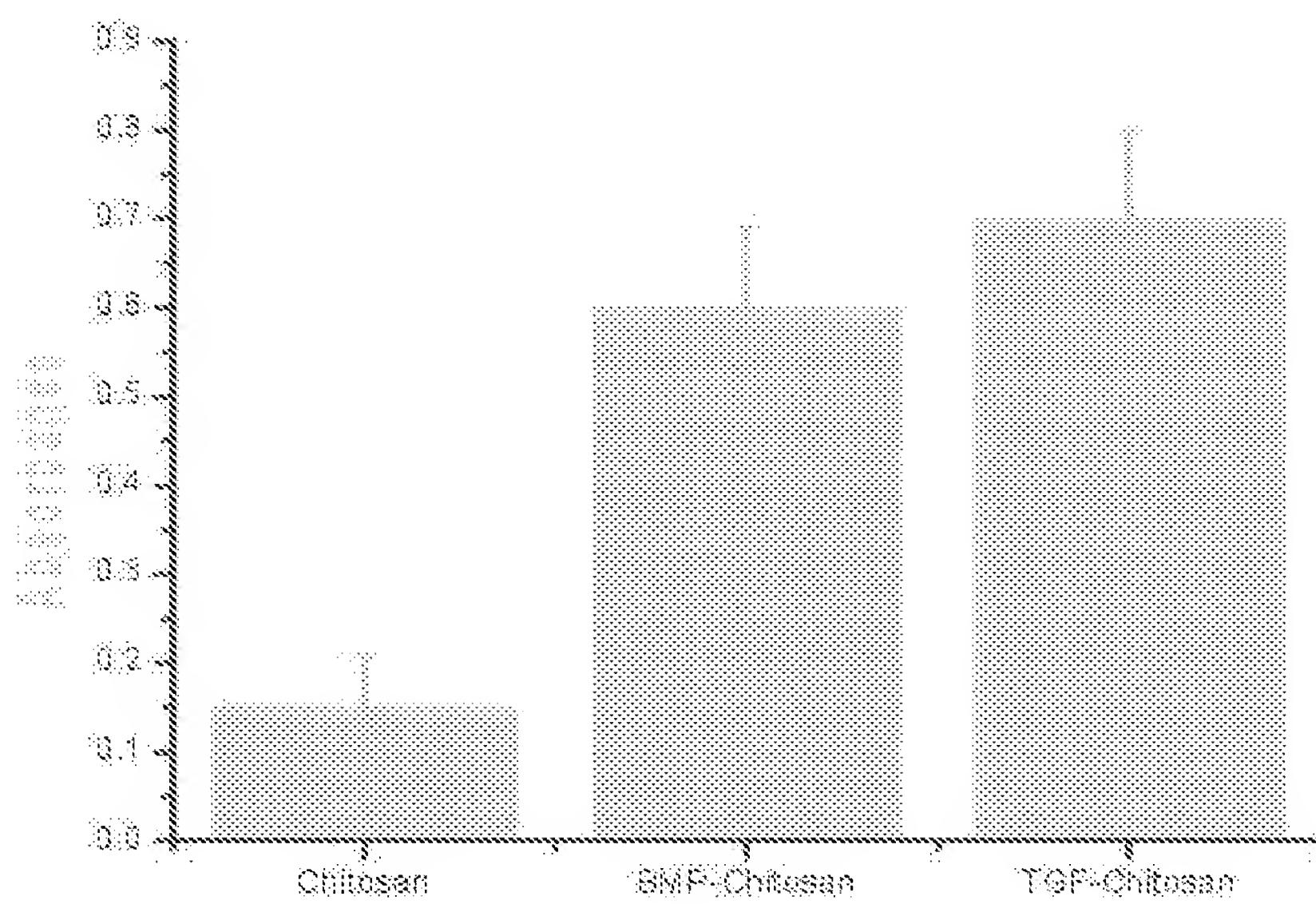
【도 2b】



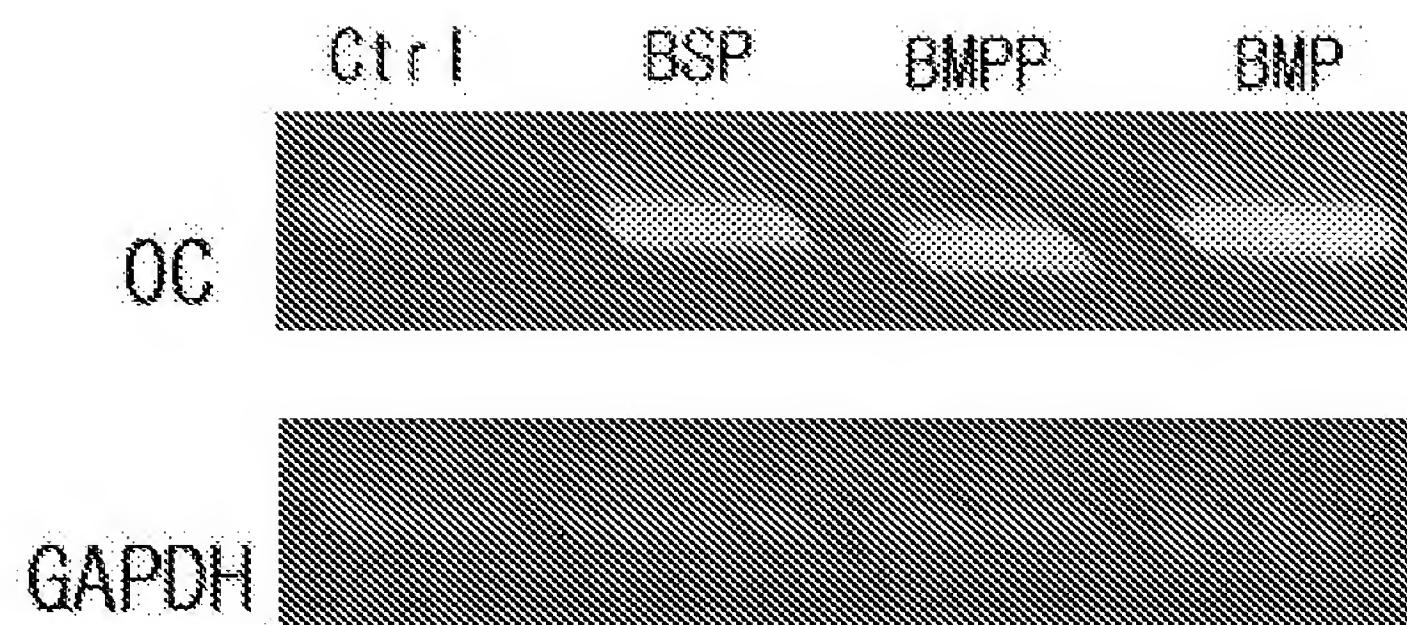
【도 2c】



【도 3】



【도 4】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

<110> SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION

<120> MEMBRANE AND IMPLANT IMMIBOLIZED OSTEOGENIC ENHANCING PEPTIDES ON THE SURFACE

<130> 4p-01-36

<160> 60

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Gly Asp

1

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys Gly Gly Arg Gly Asp Ser

1

5

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Gly Gly Val Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1 5 10

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg

1 5 10 15

His Pro Leu Tyr

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser

1 5 10 15

Met Leu Tyr Leu

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr

1

5

10

15

Gln Asp Met Val Val

20

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys Arg

1

5

10

15

Arg His Ser Leu Tyr

20

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile

1

5

10

15

Ser Met Leu Tyr Leu

20

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr

1

5

10

15

Gln Glu Met Val Val

20

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

Val Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Ser Ser Glu Leu Lys Thr Ala Cys

1

5

10

15

Arg Lys His Glu Leu Tyr

20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser

1

5

10

15

Val Leu Tyr Phe

20

<210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 12
Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr

1 5 10 15

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys
20

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13
Glu Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu

1 5 10 15

Tyr Val Ser Phe Arg
20

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 14
Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile Ser

1 5 10 15

Val Leu Tyr Phe

20

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 15

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr

1

5

10

15

Arg Asn Met

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 16

Glu Glu Gly Glu Glu Glu

1

5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1

5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18
Tyr Glu Ile Tyr Glu Ser Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Asn Tyr

1 5 10 15

Arg

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 19
Lys Asn Leu His Arg Arg Val Lys Ile

1 5

<210> 20
<211> 26
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 20
Asp Ser Ser Glu Glu Asn Gly Asp Asp Ser Ser Glu Glu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Thr Ser Asn Glu Gly Glu Asn
20 25

<210> 21
<211> 21
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 21
Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Asn Glu Asn Glu Glu Ser
1 5 10 15
Glu Ala Glu Val Asp
20

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 22
Ser Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Asn Tyr
1 5 10

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 23
Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr
1 5

<210> 24
<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys

1

5

10

15

Cys Val Arg Gln Leu

20

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val

1

5

10

15

Pro Gln Ala

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 26

Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Gln Glu Gln Arg

20

<210> 27
<211> 20
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 27
Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg Thr Val Arg

1 5 10 15

Arg Pro Pro Lys
20

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 28
Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys

1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 29
Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys

1 5

<210> 30
<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 30

Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys

1

5

10

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 31

Pro Asp Gly Arg Val Asp

1

5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 32

Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu

1

5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 33

Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr

1

5

<210> 34
<211> 21
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 34
Glu Asp Glu Gly Ser Gly Asp Asp Glu Asp Glu Ala Gly Asn Gly
1 5 10 15

Lys Asp Ser Ser Asn
20

<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 35
Asp Asp Ala Asn Ser Glu Ser Asp Asn Asn Ser Ser Ser Arg Gly Asp
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Asn
20

<210> 36
<211> 23
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 36
Asp Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser
1 5 10 15

Ser Asp Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 37

<211> 22

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 37

Asp Leu Gln Glu Ala Asp Leu Ala Leu Leu Arg Val Thr Leu Ser Ser

1

5

10

15

Lys Pro Gln Ala Leu Ala

20

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 38

Ala Thr Pro Asn Lys Glu Glu His Gly Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys

1

5

10

15

Gly Leu Gly Lys

20

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 39

Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg Lys Tyr Lys Asp Phe Cys

1 5 10

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 40

Cys Lys Tyr Val Lys Glu Leu Arg Ala Pro Ser Cys Ile Cys His Pro

1 5 10 15

Gly Tyr His Gly

20

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 41

Pro Gln Tyr Asn Tyr Gln Thr Leu Val Pro Glu Asn Glu Ala Ala Gly

1 5 10 15

Thr Ala Val Leu Arg Val Val Ala Gln

20 25

<210> 42

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 42
Asp Pro Asp Ala Gly Glu Ala Gly Arg Leu Val Tyr Ser Leu Ala Ala
1 5 10 15

Leu Met Asn Ser Arg
20

<210> 43
<211> 29
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 43
Ser Leu Glu Leu Phe Ser Ile Asp Pro Gln Ser Gly Leu Ile Arg Thr
1 5 10 15

Ala Ala Ala Leu Asp Arg Glu Ser Met Glu Arg His Tyr
20 25

<210> 44
<211> 23
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 44
Leu Arg Val Thr Ala Gln Asp His Gly Ser Pro Arg Leu Ser Ala Thr
1 5 10 15

Thr Met Val Ala Val Thr Val
20

<210> 45
<211> 112

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 45

Glu Gln Ala Gln Tyr Arg Glu Thr Leu Arg Glu Asn Val Glu Glu Gly

1 5 10 15

Tyr Pro Ile Leu Gln Leu Arg Ala Thr Asp Gly Asp Ala Pro Pro Asn

20 25 30

Ala Asn Leu Arg Tyr Arg Phe Val Gly Pro Pro Ala Ala Arg Ala Ala

35 40 45

Ala Ala Ala Ala Phe Glu Ile Asp Pro Arg Ser Gly Leu Ile Ser Thr

50 55 60

Ser Gly Arg Val Asp Arg Glu His Met Glu Ser Tyr Glu Leu Val Val

65 70 75 80

Glu Ala Ser Asp Gln Gly Gln Glu Pro Gly Pro Arg Ser Ala Thr Val

85 90 95

Arg Val His Ile Thr Val Leu Asp Glu Asn Asp Asn Ala Pro Gln Phe

100 105 110

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 46

Ser Glu Lys Arg Tyr Val Ala Gln Val Arg Glu Asp Val Arg Pro His

1 5 10 15

Thr Val Val Leu Arg Val Thr Ala Thr Asp Arg Asp Lys Asp Ala Asn
20 25 30

Gly Leu Val His Tyr Asn Ile Ile Ser Gly Asn Ser Arg Gly His Phe
35 40 45

Ala Ile Asp Ser Leu Thr Gly Glu Ile Gln Val Val Ala Pro Leu Asp
50 55 60

Phe Glu Ala Glu Arg Glu Tyr Ala Leu Arg Ile Arg Ala Gln Asp Ala
65 70 75 80

Gly Arg Pro Pro Leu Ser Asn Asn Thr Gly Leu Ala Ser Ile Gln Val
85 90 95

Val Asp Ile Asn Asp His Ile Pro Ile Phe
100 105

<210> 47
<211> 59
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 47
Asp Asp Asn Val Cys Leu Arg Glu Pro Cys Glu Asn Tyr Met Lys Cys
1 5 10 15

Val Ser Val Leu Arg Phe Asp Ser Ser Ala Pro Phe Leu Ala Ser Ala
20 25 30

Ser Thr Leu Phe Arg Pro Ile Gln Pro Ile Ala Gly Leu Arg Cys Arg
35 40 45

Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Asp Phe Cys Glu

50 55

<210> 48
<211> 37
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 48
Glu Leu Asp Leu Cys Tyr Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ala Cys
1 5 10 15

Ala Arg Arg Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Val Cys Arg Pro Arg Phe Thr
20 25 30

Gly Glu Asp Cys Glu
35

<210> 49
<211> 40
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 49
Glu Ala Gly Arg Cys Val Pro Gly Val Cys Arg Asn Gly Gly Thr Cys
1 5 10 15

Thr Asp Ala Pro Asn Gly Gly Phe Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Gly
20 25 30

Ala Phe Glu Gly Pro Arg Cys Glu
35 40

<210> 50

<211> 205
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 50
Val Ala Ala Arg Ser Phe Pro Pro Ser Ser Phe Val Met Phe Arg Gly

1 5 10 15

Leu Arg Gln Arg Phe His Leu Thr Leu Ser Leu Ser Phe Ala Thr Val
20 25 30

Gln Gln Ser Gly Leu Leu Phe Tyr Asn Gly Arg Leu Asn Glu Lys His
35 40 45

Asp Phe Leu Ala Leu Glu Leu Val Ala Gly Gln Val Arg Leu Thr Tyr
50 55 60

Ser Thr Gly Glu Ser Asn Thr Val Val Ser Pro Thr Val Pro Gly Gly
65 70 75 80

Leu Ser Asp Gly Gln Trp His Thr Val His Leu Arg Tyr Tyr Asn Lys
85 90 95

Pro Arg Thr Asp Ala Leu Gly Gly Ala Gln Gly Pro Ser Lys Asp Lys
100 105 110

Val Ala Val Leu Ser Val Asp Asp Cys Asp Val Ala Val Ala Leu Gln
115 120 125

Phe Gly Ala Glu Ile Gly Asn Tyr Ser Cys Ala Ala Ala Gly Val Gln
130 135 140

Thr Ser Ser Lys Lys Ser Leu Asp Leu Thr Gly Pro Leu Leu Leu Gly
145 150 155 160

Gly Val Pro Asn Leu Pro Glu Asn Phe Pro Val Ser His Lys Asp Phe

165 170 175

Ile Gly Cys Met Arg Asp Leu His Ile Asp Gly Arg Arg Val Asp Met

180 185 190

Ala Ala Phe Val Ala Asn Asn Gly Thr Met Ala Gly Cys

195 200 205

<210> 51

<211> 181

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 51

Pro His His Phe Arg Gly Asn Gly Thr Leu Ser Trp Asn Phe Gly Ser

1 5 10 15

Asp Met Ala Val Ser Val Pro Trp Tyr Leu Gly Leu Ala Phe Arg Thr

20 25 30

Arg Ala Thr Gln Gly Val Leu Met Gln Val Gln Ala Gly Pro His Ser

35 40 45

Thr Leu Leu Cys Gln Leu Asp Arg Gly Leu Leu Ser Val Thr Val Thr

50 55 60

Arg Gly Ser Gly Arg Ala Ser His Leu Leu Leu Asp Gln Val Thr Val

65 70 75 80

Ser Asp Gly Arg Trp His Asp Leu Arg Leu Glu Leu Gln Glu Glu Pro

85 90 95

Gly Gly Arg Arg Gly His His Val Leu Met Val Ser Leu Asp Phe Ser

100 105 110

Leu Phe Gln Asp Thr Met Ala Val Gly Ser Glu Leu Gln Gly Leu Lys

115 120 125

Val Lys Gln Leu His Val Gly Gly Leu Pro Pro Gly Ser Ala Glu Glu

130 135 140

Ala Pro Gln Gly Leu Val Gly Cys Ile Gln Gly Val Trp Leu Gly Ser

145 150 155 160

Thr Pro Ser Gly Ser Pro Ala Leu Leu Pro Pro Ser His Arg Val Asn

165 170 175

Ala Glu Pro Gly Cys

180

<210> 52

<211> 36

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 52

Cys Pro Cys Arg Pro Gly Ala Leu Gly Arg Gln Cys Asn Ser Cys Asp

1 5 10 15

Ser Pro Phe Ala Glu Val Thr Ala Ser Gly Cys Arg Val Leu Tyr Asp

20 25 30

Ala Cys Pro Lys

35

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 53

Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro

1 5 10 15

Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp

20 25 30

Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly Ala Gly Thr Ile Phe

35 40 45

Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala Thr Lys Thr Leu Asp

50 55 60

Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala Gln Ala Val Asp Arg

65 70 75 80

Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu Phe Ile Val Lys Val

85 90 95

Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe

100 105

<210> 54

<211> 109

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 54

Leu His Glu Thr Tyr His Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly

1 5 10 15

Thr Ser Val Ile Gln Val Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Ala Lys Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr
35 40 45

Phe Ser Val Glu Ala Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn
50 55 60

Met Asp Arg Glu Ala Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys
65 70 75 80

Asp Met Gly Gly His Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr
85 90 95

Ile Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe
100 105

<210> 55

<211> 115

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 55

Pro Gln Arg Leu Tyr Gln Met Ser Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Glu Val Gly Arg Val Lys Ala Lys Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn
20 25 30

Gly Leu Val Thr Tyr Asn Ile Val Asp Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe
35 40 45

Glu Ile Thr Thr Asp Tyr Glu Thr Gln Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys
50 55 60

Lys Pro Val Asp Phe Glu Thr Glu Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu
65 70 75 80

Ala Ala Asn Val His Ile Asp Pro Lys Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe
85 90 95

Lys Asp Thr Val Thr Val Lys Ile Ser Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro
100 105 110

Pro Met Phe
115

<210> 56
<211> 106
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 56
Pro Met Phe Leu Ala Pro Ser Tyr Ile His Glu Val Gln Glu Asn Ala
1 5 10 15

Ala Ala Gly Thr Val Val Gly Arg Val His Ala Lys Asp Pro Asp Ala
20 25 30

Ala Asn Ser Pro Ile Arg Tyr Ser Ile Asp Arg His Thr Asp Leu Asp
35 40 45

Arg Phe Phe Thr Ile Asn Pro Glu Asp Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys
50 55 60

Pro Leu Asp Arg Glu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Ile Thr Val Phe Ala
65 70 75 80

Ala Glu Ile His Asn Arg His Gln Glu Ala Gln Val Pro Val Ala Ile
85 90 95

Arg Val Leu Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro

100 105

<210> 57
<211> 126
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 57

Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile Cys Glu Ser Asp Gln Thr
1 5 10 15

Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr Ile Ser Ala Asp Asp Lys
20 25 30

Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile Phe Ser Leu Pro Pro Glu
35 40 45

Ile Ile His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg Asp Asn Arg Asp Asn Thr
50 55 60

Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe Ser Arg Gln Lys Gln Asp
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp Gly Gly Ile Pro Pro Met
85 90 95

Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Lys Val Cys Gly Cys Asp Val Asn
100 105 110

Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala Tyr Ile Leu Asn
115 120 125

<210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> homo sapines

<400> 58
Cys Gly Gly Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser
1 5 10 15

Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu
20

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 59
Cys Gly Gly Glu Glu Gly Glu Glu Glu
1 5

<210> 60
<211> 20
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 60
Cys Gly Gly Tyr Glu Ile Tyr Glu Ser Glu Asn Gly Glu Pro Arg Gly
1 5 10 15

Asp Asn Tyr Arg
20